

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 457**

51 Int. Cl.:

A61K 31/734 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2010 PCT/GB2010/002181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11064547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2010 E 10799116 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2504016**

54 Título: **Inhibición de la lipasa pancreática**

30 Prioridad:

25.11.2009 GB 0920633

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.08.2017

73 Titular/es:

**RD BIOMED LIMITED (50.0%)
Daisy Building (2nd Floor) Castle Hill Hospital
Castle Road
Cottingham, Hull East Yorkshire HU16 5JQ, GB y
UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**RICHARDSON, JOHNATHAN, CRAIG;
DETTMAR, PETER, WILLIAM;
WILCOX, MATTHEW, DAVID;
BROWNLEE, LAIN, ANDREW y
PEARSON, JEFFREY, PETER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 631 457 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibición de la lipasa pancreática

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a la inhibición de la lipasa pancreática e incluye compuestos, composiciones y procesos para lograrlo.

10 Antecedentes de la Invención

El alginato es un polisacárido no ramificado que contiene dos epímeros del ácido urónico [1]. El ácido manurónico (M) y su epímero C-5, el ácido gulurónico (G), están unidos mediante enlaces glicosídicos α y β (1 \rightarrow 4) [2]. La composición de un alginato puede calcularse mediante la frecuencia de la diada de vecinos cercanos mediante el uso de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C [3]. El alga marina parda es la principal fuente comercial de alginato, donde se encuentra como un componente estructural de la pared celular. La distribución de los residuos ácidos es de gran importancia ya que ellos confieren características específicas. Niveles más altos de residuos M proporcionan un aumento en la flexibilidad de esa sección del alga marina. Por ejemplo, el nivel más alto de residuos M en la *Laminaria hyperborea* se halla en el tejido foliar, mientras que el estipe es más bajo en residuos M, con niveles aún más bajos en la corteza externa [4]. Los alginatos no sólo se producen por las algas, sino además por las bacterias. En la bacteria del suelo, *Azotobacter vinlandii*, los alginatos son los constituyentes principales de la cápsula vegetativa y de las paredes rígidas y resistentes a la desecación de los quistes metabólicamente latentes [5]. Los alginatos producidos por muchas bacterias, por ejemplo *Pseudomonas spp.*, parecen tener múltiples funciones en la protección del medio ambiente, mientras que tanto los alginatos bacterianos como de algas marinas pueden estimular el sistema inmunitario humano [5].

Se han aislado y purificado enzimas que poseen la capacidad de epimerizar los residuos M a residuos G a partir de cepas bacterianas que utilizan alginatos. Se ha purificado una familia de siete enzimas epimerasas (AlgE1 - 7) a partir de *A. vinlandii*, y su describió su actividad. Es probable que cada enzima produzca un patrón de distribución de monómeros distinto, por ejemplo AlgE1 es la única enzima epimerásica doble que crea dos residuos G consecutivos, mientras que las otras enzimas epimerasas sólo pueden afectar un residuo a la vez. Los alginatos bacterianos pueden crearse como polímeros de residuos M homopoliméricos y después pueden procesarse mediante las enzimas a sus características deseadas. Se han desarrollado cepas negativas para epimerasa de *Pseudomonas fluorescens*, lo que permite cosechar alginatos de residuos M puros cuando las bacterias se cultivan en un medio que contiene una alta concentración de D-fructosa-6-fosfato [6].

Un rango variable de lipasas se producen dentro del cuerpo humano así como por las bacterias, todas las cuales son responsables de la catálisis de la hidrólisis de enlaces éster en los triacilglicerol. Con la excepción de la lipasa pancreática, todas las lipasas son enzimas de un solo dominio. La lipasa pancreática requiere otra proteína (colipasa) para su actividad en presencia de sales biliares o detergentes [7]. La colipasa (11 000 Da) está implicada en la actividad de la enzima, la prevención de la desnaturalización en la interfase agua-lípido e invierte el efecto inhibitorio de las sales biliares en la misma interfase. Hay dos conformaciones de la lipasa pancreática, la forma abierta (activa) y la forma cerrada (inactiva) [8]. La conformación se cambia a través del movimiento de dos bucles de aminoácidos que descubren el sitio activo hidrofóbico. La unión de la colipasa no inicia la actividad de la enzima ni inicia el movimiento de los bucles pero, cuando la colipasa se une a la interfase lípido-agua, los bucles hacen múltiples contactos con la colipasa cuando están en la conformación abierta [8]. Existe un pliegue común a través de todas las lipasas denominado pliegue α/β hidrolasa debido a la orientación de las hélices α y la distribución de las cadenas β . El sitio activo de la lipasa pancreática está compuesto por una tríada catalítica serina-histidina-aspartato y esta tríada está bien conservada a través de la familia lipasa [8]. Es probable que el sustrato lipídico penetre en el sitio activo en una orientación de "horquilla" [9] con una cadena de acilo (una punta) en el sitio activo y la segunda cadena de acilo (segunda punta) extendida a lo largo del exterior de la molécula de lipasa en un canal creado por dos residuos de fenilalanina [10].

Algunos tratamientos farmacológicos de la obesidad, por ejemplo Orlistat (Marca Registrada), funcionan mediante la inhibición específica e irreversible de las lipasas gastrointestinales, de las cuales la lipasa pancreática es la más biológicamente activa e importante en humanos saludables [11]. Se reportan comúnmente una serie de efectos informados para el Orlistat, que incluyen esteatorrea, hinchazón, manchas oleosas, urgencia fecal e incontinencia fecal que pueden afectar hasta el 40% de los pacientes [12]. Esto conduce a altas tasas de desgaste y problemas de tolerabilidad. Un producto que mantenga el nivel de inhibición de la lipasa, pero que reduzca o elimine los efectos adversos del tratamiento actual, sería de considerable beneficio para los pacientes.

El documento núm. US2005/170059 describe composiciones que comprenden un alginato y una fuente de iones metálicos divalentes no solubilizados. Las composiciones pueden destinarse para usarse como parte de un plan de pérdida de peso o de control de peso.

El documento núm. US5324526 describe un alimento o bebida que contiene algina. No hay descripción de la fracción de residuos de guluronato en la algina.

5 La base de datos WPI Week 199719 Thomson Scientific, y las patentes AN 1997-204068 y CN1097307 se refieren a un alimento de algas marinas para perder peso, que comprende alginato de potasio oligomérico. No hay descripción de la fracción de residuos de guluronato en el alginato de potasio oligomérico para utilizarla en la composición.

10 El artículo científico "Daily ingestion of alginate reduces energy intake in free-living subjects" (Paxman JR y otros, APPETITE, vol. 51, núm. 3, 1 de noviembre de 2008, páginas 713 a 719) exploró los efectos del uso de alginato de sodio en la moderación del apetito. El alginato de sodio se administró en forma de una composición que incluía además carbonato de calcio.

15 El artículo científico "Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential" (Birari y otros, Drug Delivery Today, vol. 12, núm. 19-20, 11 de octubre de 2007, páginas 879-889) revisa los extractos y metabolitos secundarios de fuentes naturales para identificar alguno que pueda enfocarse para programas de desarrollo de fármacos.

20 El documento núm. US6432400 explora los inhibidores específicos de la lipasa pancreática y sus aplicaciones en el tratamiento y prevención de las enfermedades cardiovasculares, de la hiperlipemia y de la obesidad, así como los reactivos de diagnóstico y como agente regulador en un proceso de lipólisis controlada de triglicéridos.

25 El artículo científico "Basic studies on the development of diet for the treatment of obesity. The inhibitory effect of alginic acid as a dietary fiber on obesity" (Choi JH y otros, Journal of the Korean Fisheries Society, vol. 19, núm. 4, 1986, páginas 303 a 311) explora el efecto de cambiar la dieta de las ratas, y en particular, si tales cambios pueden ser útiles en el tratamiento de la obesidad.

El documento núm. WO 2008/098579 describe un producto dietético que comprende un alginato.

30 El documento núm. US2003/176394 se refiere a composiciones que incluyen alginatos y su uso en la inhibición de pepsina y jugo gástrico.

Declaraciones de la Invención

35 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una cantidad eficaz de un alginato para su uso en un método de inhibición de la lipasa pancreática en donde la fracción de los residuos de guluronato en el alginato es de al menos 0,5. El alginato puede derivarse de cualquier fuente adecuada, que incluye las algas marinas. Puede ser un alginato bacteriano, en particular, un alginato que no ha sido epimerizado (es decir, alginato 1:PAG). Puede ser alternativamente un alginato sintético.

40 Preferentemente, la fracción de los dímeros de guluronato en el alginato es de al menos 0,3.

Preferentemente, la fracción de trímeros de guluronato en el alginato es de al menos 0,25.

Preferentemente, la fracción de bloques MGM en el alginato es menor de 0,2.

45 La inhibición de la lipasa pancreática puede dirigirse, total o parcialmente, a controlar el peso en animales, que incluye los seres humanos.

50 Preferentemente, la cantidad de alginato administrado es a partir de 0,1 hasta 10 g como una dosis diaria, con mayor preferencia de 0,5 hasta 10 g como una dosis diaria y con la máxima preferencia de 0,5 g hasta 8 g como una dosis diaria.

Descripción detallada de la Invención

La invención se describirá ahora, sólo a manera de ejemplos:

55 Ejemplo 1

Sección Experimental

60 Materiales

Todas las muestras de alginato fueron amablemente proporcionadas por Technostics (Hull, UK y FMC BioPolymer, Noruega). La tris(hidroximetil)-metilamina y el cloruro de calcio se adquirieron de BDH (Poole, UK). Los ácidos biliares (sal sódica del ácido desoxicólico y sal sódica del ácido taurodesoxicólico) se adquirieron de Fluka (Buchs, Suiza),

mientras que el 1,2 Di-o-lauril-rac-glicero-3-(ácido glutárico-(6-metil-resorufina)-éster) (DGGR), el acetato de sodio, la colipasa, la lipasa y el Orlistat (tetrahidrolipstatina) se adquirieron todos de Sigma-Aldrich (Poole, UK).

Equipos

5

La absorbancia se midió a 580 nm mediante el uso de un espectrofotómetro ATI Unicam 8625 UV/VIS con cubetas semimicro (paso luz 10 mm) (Fisher, UK FB55147) o un espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos mediante el uso de un filtro de 575 nm (EL808 BioTek, Bedfordshire UK).

10 Preparación

15 El ensayo de actividad de lipasa es una versión modificada del método desarrollado por Panteghini y otros [13]. El ensayo requiere tres soluciones, Solución 1, Solución 2 y la Solución lipasa. La solución 1 contiene 1 mg/l de colipasa y 1,8 mmol/l de sal sódica de ácido desoxicólico en tampón Tris (50 mmol/l, pH 8,4 a 25 °C). La solución 2 contiene 72 mmol/l de sal sódica de ácido taurodesoxicólico, 0,1 mmol/l de cloruro de calcio y 0,24 mmol/l de DGGR en tampón acetato (18 mmol/l, pH 4,0 a 25 °C). La solución 2 se mezcló en un agitador magnético a 500 rpm y 4 °C toda la noche. La solución lipasa contiene 1 g/l de lipasa pancreática porcina en agua desionizada, donde 1 mg contiene 60 U de actividad lipasa.

20 Para todas las muestras de polímero de alginato, se preparó una solución madre que contiene 4 g/l de polímero, mediante la adición lenta de polvo de polímero seco a una mezcla en agitación de la solución 1. Después, la solución madre se diluyó con tampón para producir muestras de ensayo de polímero que contienen 0,25, 1 y 4 g/l de polímero. Cuando las tres muestras de ensayo de polímero se añadieron a la mezcla de reacción, la concentración de alginato en la mezcla de reacción fue de 0,21, 0,86 y 3,43 g/l, respectivamente. Como control positivo, se añadió Orlistat a 0,025 g/l a la solución 1. Todas las soluciones se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Procedimiento

Ensayo de actividad lipasa

30

Se evaluó la actividad de la lipasa bajo tres condiciones. En primer lugar, se determinó la actividad lipasa bajo condiciones óptimas de ensayo en las que puede lograrse un 100% de actividad. Estas condiciones se denominan condiciones de Control de Lipasa.

35 Se mezcló 1,5 ml de Solución 1 con 100 µl de Solución Lipasa y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Paralelamente, se incubó además 150 µl de Solución 2 a 37 °C durante 60 minutos antes de combinarse con la mezcla Solución 1: Solución Lipasa, y después se incubó durante 35 minutos adicionales. Una vez que se añadió la Solución 2 a la mezcla enzimática, se observó una fase de retardo de dos minutos y después se leyó la absorbancia a intervalos de cinco minutos durante 35 minutos a 575 nm para el ensayo en placa, o a 580 nm para el ensayo en cubetas. Se prepararon además blancos reactivos para eliminar el efecto que tienen los productos químicos adicionales sobre la absorbancia. Para lograr esto, 100 µl de agua desionizada sustituyeron los 100 µl de solución lipasa añadidos a las condiciones de prueba. Los blancos reactivos respectivos se restaron de su condición de control o de prueba.

40

45 La segunda condición bajo la cual se evaluó la actividad lipasa fue en presencia de un inhibidor covalente conocido, la tetrahidrolipstatina (Orlistat). Bajo estas condiciones, se añadió 0,025 g/l de Orlistat a la Solución 1 antes de la incubación y se siguió la metodología de ensayo anterior. El Orlistat inhibe completamente la lipasa y fue usado como un control positivo para la inhibición. Estas condiciones se denominan condiciones de Control de Inhibición.

50

La condición final en la cual se evaluó la actividad lipasa fue en presencia de un polímero de alginato. Se añadieron polímeros a la Solución 1 (0,25 - 4 g/l) antes de la incubación y se siguió la metodología de ensayo anterior. Estas condiciones se denominan como Condiciones de Prueba.

55

Para calcular el porcentaje de inhibición de la lipasa mediante alginatos, se usaron los valores de absorbancia bajo Condiciones de Prueba, condiciones de Control de Inhibición y condiciones de Control de Lipasa, y se aplicó la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de Inhibición de Lipasa} = 1 - \frac{\text{Condición de prueba} - \text{Control de inhibición}}{\text{Control de Lipasa} - \text{Control de inhibición}} \times 100$$

60

Los valores de absorbancia usados para el cálculo de la inhibición enzimática fueron mediciones tomadas después que las Soluciones 1, 2 y la solución de lipasa se incubó durante 12 minutos. En esta etapa, la reacción estaba aún en su fase lineal.

65

Todos los ensayos de actividad lipasa fueron repetidos seis veces.

La lipasa escindirá el sustrato DGGR para formar 1,2 Di-o-lauril-rac-glicerol y un compuesto ácido glutárico-(6-metil-resorufina)-éster. Después el éster se hidroliza espontáneamente en condiciones alcalinas a ácido glutárico y produce un cromóforo púrpura (metil resorufina). El aumento de la absorbancia a 575 - 580 nm es una medida de la actividad lipasa. El ensayo en cubetas fue adaptado para un ensayo de microplaca de 96 pocillos. El procedimiento y el método permanecieron iguales, sin embargo se aplicó una reducción de diez veces en volumen para permitir que los volúmenes cupieran en una placa.

10 **Análisis Estadístico**

Todos los análisis estadísticos y el dibujo de los gráficos se realizaron mediante el uso de las funciones estándar del software de análisis Prism versión 4 (GraphPad, San Diego, EE.UU.).

15 **Ejemplo 2**

Alginato XP3663

20 **Método**

El ensayo de actividad lipasa es una versión modificada del método desarrollado por Panteghini y otros [13]. El ensayo comprende tres soluciones, Solución 1, Solución 2 y la Solución Lipasa. La Solución 1 contiene, por litro de tampón Tris (50 mmol/l, pH 8,4 a 23 °C), 1 mg de colipasa y 1,8 mmol de sal sódica de ácido desoxicólico. La Solución 2 contiene, por litro de tampón acetato (18 mmol/l, pH 4,0 a 23 °C), 72 mmol de sal sódica de ácido taurodesoxicólico, 0,1 mmol de cloruro de calcio y 0,24 mmol de DGGR. La Solución 2 se mezcló con un agitador magnético a 500 rpm y 4 °C toda la noche. La solución lipasa contiene 1 g/l de lipasa pancreática porcina en agua desionizada, donde 1 mg contiene 60 U de actividad lipasa.

El polímero de alginato (ya sea XP3663 o LFR5/60) se añadió lentamente a una solución 1 en agitación, lo que alcanzó una concentración de 4 g/l, la cual a su vez se diluyó a 1 g/l y 0,25 g/l. Este alcanzó una concentración de 3,43 g/l, 0,86 g/l y 0,21 g/l, respectivamente, en la mezcla de reacción. Para alcanzar una inhibición del 100% en el sistema de ensayo, se añadió Orlistat a 0,025 g/l a la solución 1. Todas las soluciones se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Se añadieron 12 µl de solución lipasa a 180 µl de solución 1, a 180 µl del polímero de ensayo en solución 1 o a 180 µl de Orlistat en solución 1. El polímero de ensayo en la solución 1 (ya sea XP3663 o LFR5/60) estaba presente en las siguientes concentraciones (4, 1, o 0,25 g/l). Una vez incubado durante una hora a 37 °C, se añadieron 160 µl de las soluciones anteriores a la solución sustrato (15 µl de solución 2), lo que inicia de esta manera la reacción. Como blanco, se repitió el procedimiento anterior mediante el uso de 12 µl de agua desionizada en lugar de 12 µl de solución lipasa. La absorbancia de la reacción se midió a 575 nm cada cinco minutos durante 35 minutos, después de una fase de retardo inicial de dos minutos. Para calcular el porcentaje de inhibición de la lipasa, los blancos reactivos se restaron de los controles o muestras correspondientes y se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Inhibición de Lipasa} = 1 - \frac{\text{Muestra de polímero} - \text{Control de inhibición}}{\text{Control de Lipasa} - \text{Control de inhibición}} \times 100$$

Como un ejemplo, si el biopolímero x alcanzó una medida de absorbancia de 0,6 unidades de absorbancia, y su respectivo blanco que contiene el biopolímero y ninguna enzima alcanzó 0,19 unidades de absorbancia, entonces el valor total usado en la ecuación anterior sería de 0,41 unidades de absorbancia. Si el control de inhibición alcanzó una lectura de 0,3 unidades de absorbancia, y su blanco alcanzó 0,25 unidades de absorbancia, entonces el valor usado en la ecuación anterior sería 0,05 unidades de absorbancia. El valor que se usaría para el control de lipasa sería 0,85 unidades de absorbancia, después de que se hubiese restado el blanco de 0,12, si la reacción alcanzara una lectura de absorbancia de 0,97 unidades de absorbancia. Por lo tanto, la ecuación se leería;

$$\text{Porcentaje de Inhibición de Lipasa} = 1 - \frac{0.41 - 0.05}{0.85 - 0.05}$$

Por tanto, el biopolímero x habría inhibido la lipasa pancreática en un 55%

En este sistema de ensayo se probaron dos biopolímeros, los alginatos XP3663 y LFR5/60. Los dos alginatos se ensayaron al mismo tiempo en la misma placa mediante el uso de las mismas soluciones. Los dos alginatos se ensayaron seis veces mediante el uso de soluciones frescas cada vez.

65 **Resultados**

- La Figura 1 ilustra cómo la actividad lipasa (mostrada como un aumento de la absorbancia en el tiempo) varió bajo las tres condiciones descritas anteriormente. En las condiciones de Control de Lipasa (actividad lipasa al 100%) la absorbancia aumentó linealmente hasta 12 minutos antes de estabilizarse en un valor máximo. La Figura 1 muestra además que el Orlistat (0,025 mg/ml), un inhibidor eficaz de la lipasa, proporcionó un control positivo para la inhibición en el ensayo. El control positivo Orlistat no mostró inhibición y produjo la velocidad máxima de la reacción (Figura 1: Control de inhibición). Finalmente, la Figura 1 destaca cómo un polímero (alginato SF200) puede inhibir la lipasa, como se muestra por una reducción en el nivel de absorbancia en el tiempo en comparación con las condiciones de Control de Lipasa.
- La Figura 2 muestra el porcentaje de inhibición de la lipasa alcanzado por ocho alginatos de algas marinas pardas (cuatro extraídos de *Laminaria* y cuatro extraídos de *Lessonia*). Todos los alginatos redujeron la actividad de la lipasa; sin embargo, hubo una diferencia significativa en el nivel de inhibición dependiente del alga marina fuente del alginato. Los alginatos extraídos a partir de algas marinas *Laminaria* inhibieron la lipasa pancreática en un grado significativamente mayor ($p > 0,001$) que los alginatos extraídos a partir de *Lessonia*.
- La Figura 3 ilustra que la inhibición de la lipasa mediante alginatos fue dependiente de la concentración. Aunque la Figura 3 sólo muestra alginatos de *Laminaria*, para todos los alginatos ensayados, el aumento de la dosis de alginato logró un nivel mayor de inhibición de la lipasa pancreática.
- Las Figuras 2 y 3 muestran que no todos los alginatos inhiben la lipasa en la misma magnitud, incluso aquellos del mismo género. Una posible explicación es que hay variaciones en la composición química de los alginatos. Más específicamente, existen diferencias distintivas en el contenido y la distribución de los bloques de ácido gulurónico y manurónico constituyentes.
- Las características estructurales de los alginatos ensayados en este estudio se muestran en la Tabla 1. El polímero 1, como se muestra en la tabla, es un alginato homopolimérico de manuronato de una fuente bacteriana, los polímeros 2 - 15 son de fuente bacteriana o de algas marinas y su estructura inicial fue alterada mediante el uso de una o una combinación de enzimas epimerasas. Por ejemplo, el alginato bacteriano PAB fue alterado enzimáticamente a partir de un alginato homopolimérico de bloques M (PAG), mediante la incubación con una enzima epimerasa alternante hasta su terminación, lo que crea un polímero de principalmente bloques MG alternantes. El alginato PAT se trató solo con la misma enzima epimerasa durante 2 horas, por lo tanto, sólo aumentó el contenido de MG de 0 a 17 %. Los polímeros 16 - 19 son de algas marinas *Laminaria*, mientras que los polímeros finales listados (20 - 23) son de algas marinas *Lessonia*.

Tabla 1. Fuentes, código y características de los alginatos usados en el estudio

	Fuente de alginato	Código de la muestra	Peso Molecular	F(G)	F(M)	F(GG)	F(GM) = F(MG)	F(MM)	F(MGG) = F(GGM)	F(MGM)	F(GGG)	N(G>1)
1	Bacteriana	PAG	584400	0	1	0	0	1	0	0	0	0
2	Bacteriana (tratada con epimerasa)	PAB	456733	0.47	0.53	0	0.47	0.059	0	0.47	0	0
3	Bacteriana (tratada con epimerasa)	PAE	436767	0.52	0.48	0.38	0.14	0.34	0.037	0.12	0.34	11
4	Bacteriana (tratada con epimerasa)	PAF	442367	0.44	0.56	0.31	0.12	0.44	0.04	0.1	0.27	8
5	Bacteriana (tratada con epimerasa)	PAA	423767	0.8	0.2	0.7	0.1	0.1	0.016	0.094	0.68	44
6	Alga marina (tratada con epimerasa)	PAD	194833	0.54	0.46	0.28	0.26	0.2	0.084	0.21	0.19	4
7	Alga marina (tratada con epimerasa)	PAC	262400	0.7	0.3	0.55	0.15	0.15	0.083	0.086	0.47	7
8	Bacteriana (tratada con epimerasa)	PAI	374800	0.68	0.32	0.59	0.09	0.23	0.028	0.077	0.56	22
9	Alga marina (tratada con epimerasa)	PAJ	211833	0.62	0.38	0.44	0.18	0.2	0.067	0.115	0.37	8
10	Alga marina (tratada con epimerasa)	PAK	202000	0.62	0.38	0.45	0.17	0.21	0.115	0.091	0.34	5
11	Alga marina <i>Dunvillea potatorum</i>	PAL	241067	0.35	0.65	0.19	0.16	0.49	0.05	0.13	0.13	4
12	Alga marina (tratada con epimerasa)	PAM	251220	0.68	0.32	0.53	0.15	0.16	0.064	0.118	0.47	9
13	Alga marina (tratada con epimerasa)	PAN	226550	0.67	0.33	0.52	0.15	0.18	0.063	0.081	0.46	9
14	Alga marina <i>Laminaria hyperborea</i>	PAO	260600	0.49	0.51	0.33	0.16	0.35	0.04	0.12	0.29	9
15	Bacteriana (tratada con epimerasa)	PAT	438733	0.17	0.83	0	0.17	0.66	0	0.17	0	0
16	Alga marina <i>Laminaria</i>	LFR5/60	34700	0.633	0.367	0.505	0.128	0.239	0.054	0.096	0.45	9.9
17	Alga marina <i>Laminaria</i>	SF120	195000	0.664	0.336	0.545	0.119	0.218	0.061	0.083	0.484	9.6
18	Alga marina <i>Laminaria</i>	SF/LF	295000	0.66	0.336	0.548	0.116	0.22	0.042	0.081	0.506	13.8
19	Alga marina <i>Laminaria</i>	SF200	387000	0.68	0.322	0.573	0.105	0.218	0.036	0.079	0.537	16.7
20	Alga marina <i>Lessonia</i>	LF10L	75000	0.45	0.553	0.275	0.19	0.362	0.068	0.153	0.19	4.4
21	Alga marina <i>Lessonia</i>	LF120L	221000	0.424	0.576	0.24	0.185	0.392	0.057	0.156	0.183	4.7
22	Alga marina <i>Lessonia</i>	SF60	325000	0.411	0.589	0.219	0.195	0.393	0.077	0.155	0.139	3.3
23	Alga marina <i>Lessonia</i>	H120L	397000	0.45	0.551	0.276	0.173	0.379	0.051	0.15	0.22	5.9
24	Alga marina <i>Laminaria</i>	XP3663	150000	0.60	0.40	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Las Figuras 4 y 5 muestran que la fracción de residuos de ácido manurónico (M) o gulurónico (G) (F(M) o F(G)) en un alginato tuvo un impacto en la capacidad de ese alginato para reducir el nivel de actividad de lipasa pancreática. El coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r) en la Figura 4 es 0,502, lo que muestra que hay una relación positiva entre la fracción de guluronato en un alginato y su capacidad para inhibir la lipasa. Esto indica que el aumento de la fracción de guluronato aumenta el nivel de inhibición de la lipasa ($p = 0,01$). Por el contrario, el aumento de la fracción de manuronato en un alginato (Figura 5), disminuye el nivel de inhibición de la lipasa ($r = -0,506$ y $p = 0,01$). Esto sería de esperar, porque el aumento del contenido de una unidad de ácido urónico disminuye automáticamente la fracción de la otra.

Las Figuras 6 y 7 muestran que se observan relaciones significativas similares cuando se compara la fracción de dímeros (F(GG)) o trímeros (F(GGG)) de ácido gulurónico con el nivel de inhibición. El aumento de la fracción de bloques GG (Figura 6) y el aumento de la fracción de bloques GGG (Figura 7) en un alginato aumenta la inhibición de la lipasa. Las correlaciones en las Figuras 6 y 7 son positivas y significativas, confirmadas con valores de la r de Spearman de 0,583 y 0,578 y valores de p de 0,004

Además, la Figura 8 identifica una correlación entre el tamaño de la longitud del bloque de ácido gulurónico ($N(G > 1)$) y la capacidad del alginato para inhibir la lipasa. Está claro que mientras mayor sea la longitud del bloque de ácido gulurónico, mayor será la capacidad del alginato para inhibir la lipasa. El valor de la r de Spearman es 0,586 y el valor de p para la correlación es 0,003.

La Figura 9 muestra una relación adicional entre la composición del alginato y la inhibición de la lipasa. Parece haber una relación inversa entre la fracción de bloques MG o GM en el alginato y la inhibición de la lipasa. La correlación en la Figura 9 es negativa y tiene un valor de la r de Spearman de -0,505 y un valor de p de 0,01. Parecería que la correlación puede distorsionarse por el valor que muestre una inhibición negativa con una F(MG) de 0,47. Este valor se generó a partir del único alginato bacteriano que es casi completamente un polímero de residuos M y G alternantes, después del tratamiento con una enzima epimerasa. Sin embargo, cuando este punto se elimina del cálculo de la correlación aún hay una correlación negativa significativa con un valor de Spearman de -0,434 y un valor de p de 0,04.

De forma similar, la Figura 10 muestra que cuando la fracción de bloques MGM en el polímero de alginato F(MGM) se compara con el porcentaje de inhibición de la lipasa, hay correlación negativa. La correlación de F(MGM) con la inhibición de la lipasa tiene un valor de r de Spearman de -0,494 y un valor de p de 0,017. La correlación puede parecer distorsionarse de nuevo mediante el ejemplo extremo del alginato bacteriano polialternante (F(MGM) = 0,47). Sin embargo, en este caso, cuando el resultado del alginato bacteriano único se elimina del cálculo de la correlación, no hay correlación significativa.

Las fracciones de bloques MM (Figura 11) así como de bloques MGG/GGM (Figura 12) en alginatos se compararon además contra el nivel de inhibición de la lipasa logrado. No hubo correlación estadísticamente significativa entre los valores para ninguna de las dos fracciones de bloque. Esto no quiere decir, sin embargo, que no hay correlación en ninguna de las figuras, sino que no hay suficientes datos para sugerir una correlación significativa ya sea positiva o negativa. En las dos figuras (Figuras 11 y 12) la tendencia general de las líneas de mejor ajuste sigue la tendencia de los datos mencionados anteriormente.

La Figura 13 muestra que el alginato XP3663 fue capaz de inhibir la lipasa pancreática. El nivel máximo de inhibición de lipasa alcanzado por XP3663 fue de 56,6 % ($\pm 6,4$) a 3,43 g/l en comparación con LFR5/60 a la misma concentración el cual alcanzó el 47,6 % ($\pm 11,4$). El alginato XP3663 a 0,86 g/l alcanzó 31,0 % ($\pm 6,4$) mientras que LFR5/60 alcanzó el 19,3 % ($\pm 16,7$) y a 0,21 g/l de alginato XP3663 y de LFR5/60 alcanzó el 3,1 % ($\pm 54,6$) y el 0,1 % ($\pm 31,5$), respectivamente. No hay diferencia significativa entre los dos alginatos a la misma concentración mediante el uso de una prueba de ANOVA de dos vías.

Referencias

1. Penman, A. and G. Sanderson, Method for Determination of Uronic Acid Sequence in Alginates. Carbohydrate Research, 1972. 25(2): p. 273-282.
2. Smidsrod, O., Molecular-Basis for Some Physical Properties of Alginates in Gel State. Faraday Discussions, 1974. 57: p. 263-274.
3. Grasdalen, H., B. Larsen, and O. Smidsrod, C-13-Nmr Studies of Alginate. Carbohydrate Research, 1977. 56(2): p. C11-C15.
4. Smidsrod, O. and G. Skjak-Braek, Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology, 1990. 8(3): p. 71-8.
5. Hoidal, H.K., et al., The recombinant Azotobacter vinelandii mannuronan C-5-epimerase AlgE4 epimerizes alginate by a nonrandom attack mechanism. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(18): p. 12316-12322.
6. Gimmetstad, M., et al., The Pseudomonas fluorescens AlgG protein, but not its mannuronan C-5-epimerase activity, is needed for alginate polymer formation. Journal of Bacteriology, 2003. 185(12): p. 3515-3523.
7. Cygler, M.a.S., J.D., Lipases and alphasbeta Hydrolase Fold, in Methods in Enzymology, B.a.D. Rubin, E.A., Editor. 1997, Academic Press. p. 85/106.

8. Winkler, F.K., A. D'Arcy, and W. Hunziker, Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 1990. 343(6260): p. 771-774.
9. Egloff, M.P., et al., The 2.46-Angstrom Resolution Structure of the Pancreatic Lipase-Colipase Complex Inhibited by a C-11 Alkyl Phosphonate. *Biochemistry*, 1995. 34(9): p. 2751-2762.
- 5 10. Cambillau, C., Bourne, Y., Egloff, Martinez, C., and van Tilbeurgh, H., Pancreatic Lipases and Their Complexes with Colipase and Inhibitors: Crystallization and Crystal Packing, in *Methods in Enzymology*, B.a.D. Rubin, E.A., Editor. 1997, Academic Press. p. 107-118.
11. Hadvary, P., H. Lengsfeld, and H. Wolfer, Inhibition of Pancreatic Lipase In Vitro by the Covalent Inhibitor Tetrahydrolipstatin. *Biochemical Journal*, 1988. 256(2): p. 357-361.
- 10 12. Drew, B.S., A.F. Dixon, and J.B. Dixon, Obesity management: update on orlistat. *Vasc Health Risk Manag*, 2007. 3(6): p. 817-21.
13. Panteghini, M., R. Bonora, and F. Pagani, Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2001. 38: p. 365-370.

15

Reivindicaciones

1. Una cantidad eficaz de un alginato para su uso en un método de inhibición de la lipasa pancreática en donde la fracción de los residuos de guluronato en el alginato es de al menos 0,5.
2. El alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alginato se deriva de algas marinas.
3. El alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alginato es un alginato bacteriano.
4. El alginato para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fracción de dímeros de guluronato en el alginato es de al menos 0,3.
5. El alginato para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fracción de trímeros de guluronato en el alginato es de al menos 0,25.
6. El alginato para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fracción de bloques MGM en el alginato es menor de 0,2.
7. El alginato para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el uso se dirige al control del peso en animales, que incluye los seres humanos.
8. El alginato para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alginato se administra de 0,1 a 10 g como una dosificación diaria.

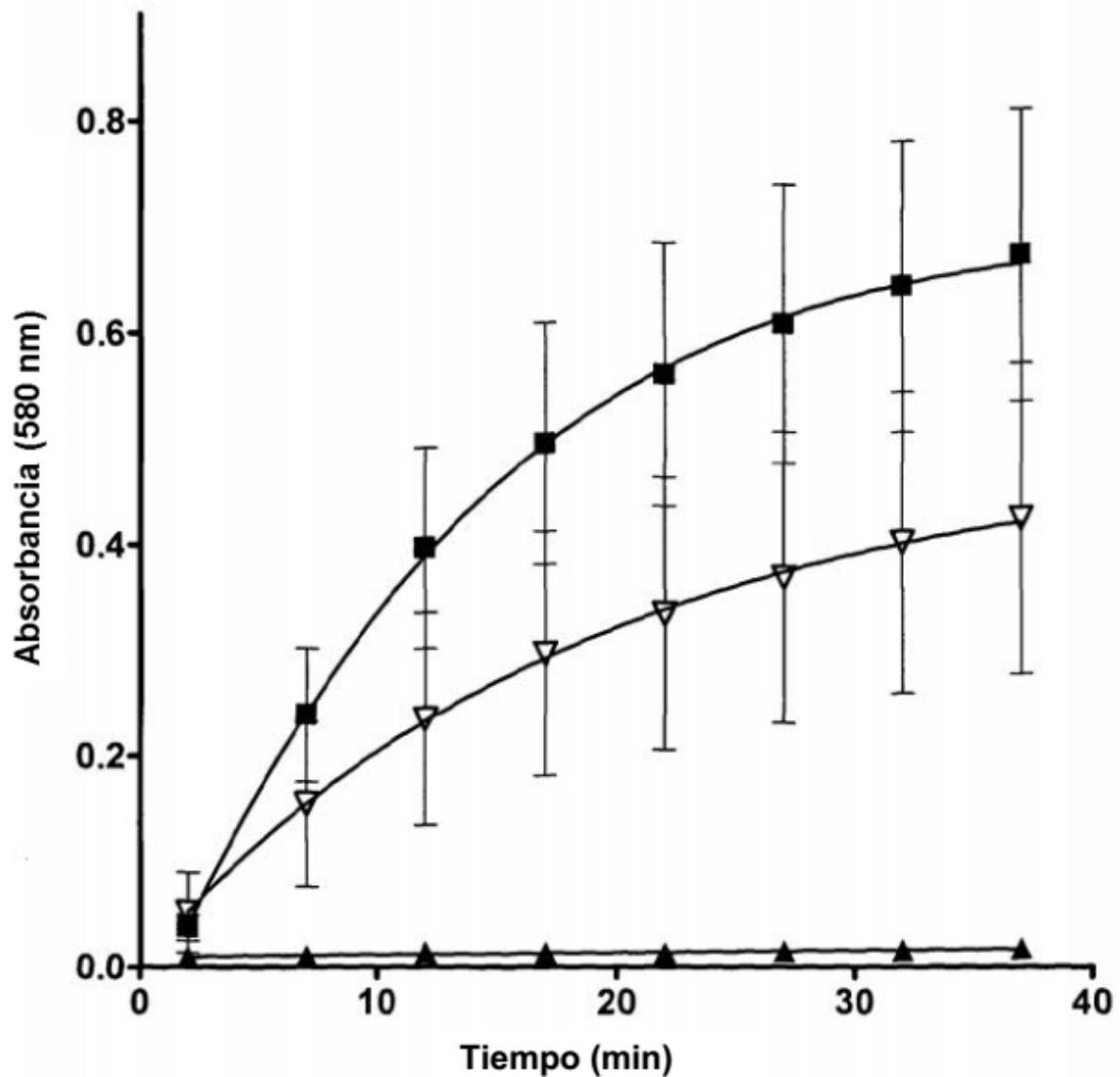


Figura 1 El cambio de la absorbancia en el tiempo como medida de la actividad lipasa. ■- Control de Lipasa (lipasa más sustrato), ▽- alginato SF200 a 3,43 mg/ml (como un ejemplo) y ▲ - Control de inhibición Orlistat 0,025 mg/ml. Las barras de error muestran el error estándar de la media (n = 6).

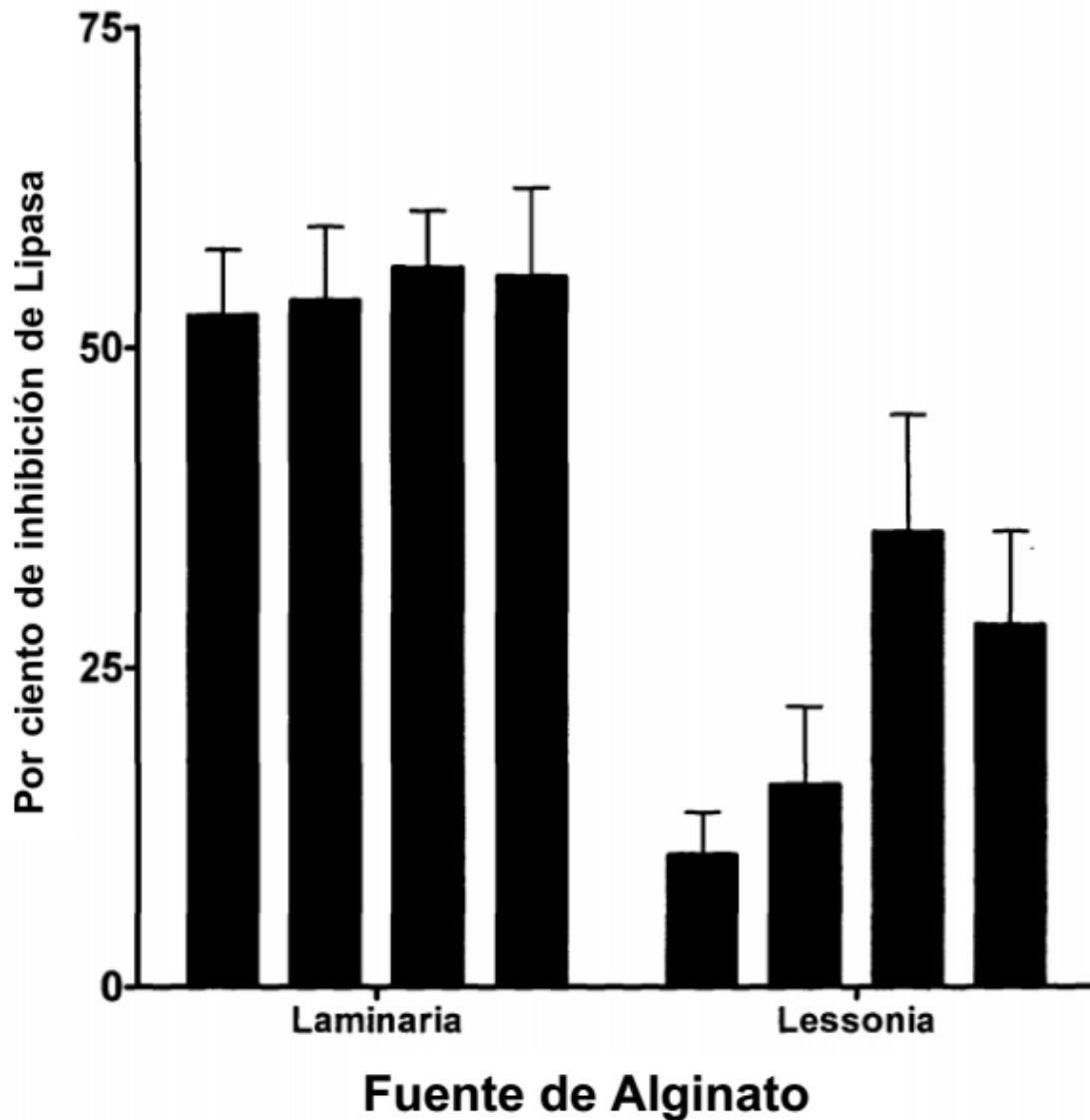


Figura 2 Comparación entre alginatos a partir de algas marinas *Laminaria* y *Lessonia*. Cuatro alginatos de peso molecular creciente (de izquierda a derecha) se muestran para *Laminaria* y *Lessonia* como sus respectivas fuentes. La inhibición de la lipasa mostrada en esta figura es causada por 3,43 mg/ml de alginato. Los alginatos a partir de la especie *Laminaria* son LFR5/60, SF120, SF/LF y los alginatos de algas marinas *Lessonia* son LF10L, LF120L, SF60 y H120L. Las barras de error mostradas son el error estándar de la media (n = 6).

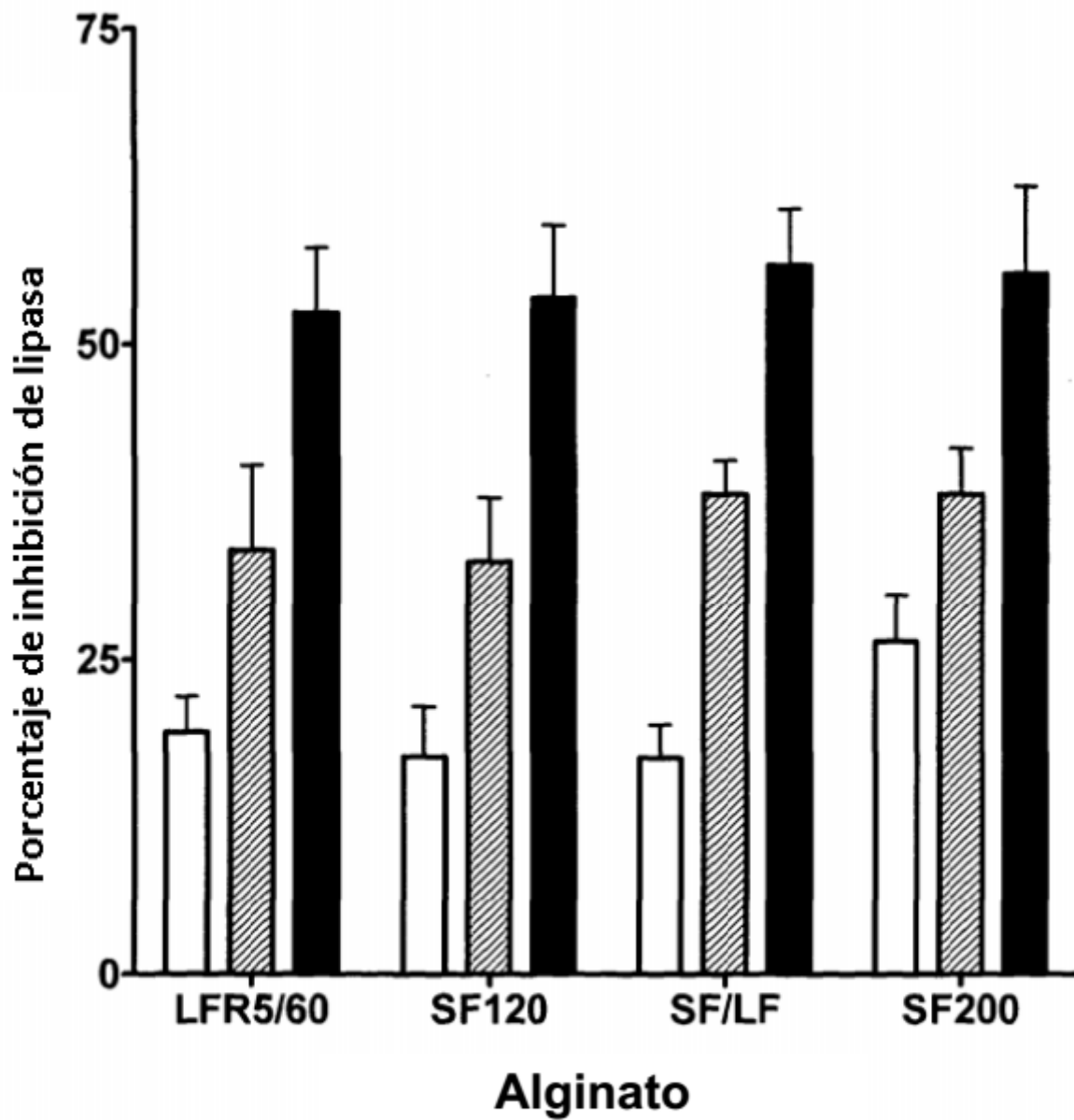


Figura 3 Inhibición de la lipasa dependiente de la concentración por los cuatro alginatos a partir del género *Laminaria* de algas marinas. □ - 0,21 mg/ml, ▨ - 0,86 mg/ml y ■ - 3,43 mg/ml. Las barras de error son el error estándar de la media (n = 6).

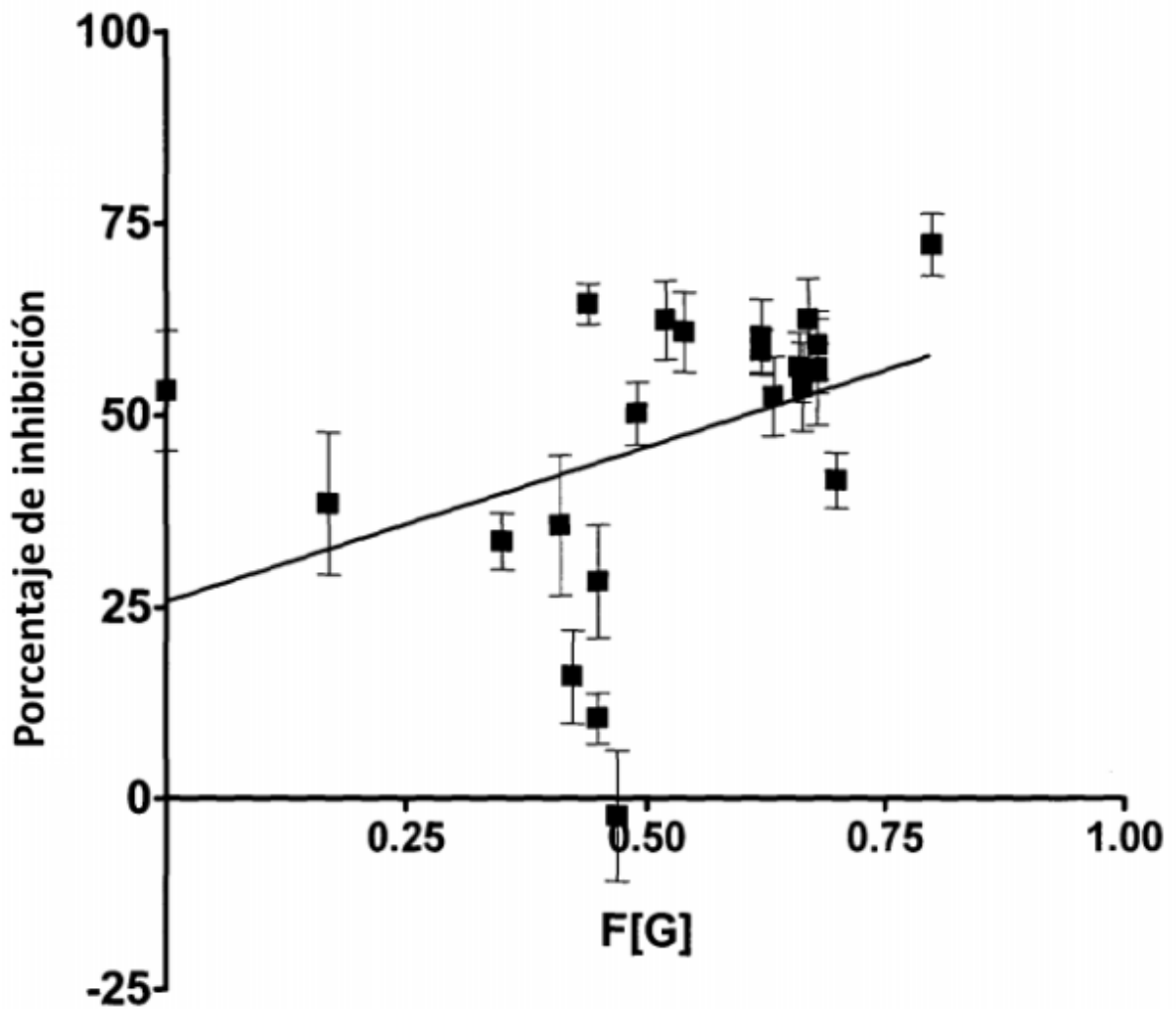


Figura 4 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato contra la fracción de residuos de guluronato (F[G]) en el polímero de alginato. Las barras de error muestran el error estándar de la media (n = 6).

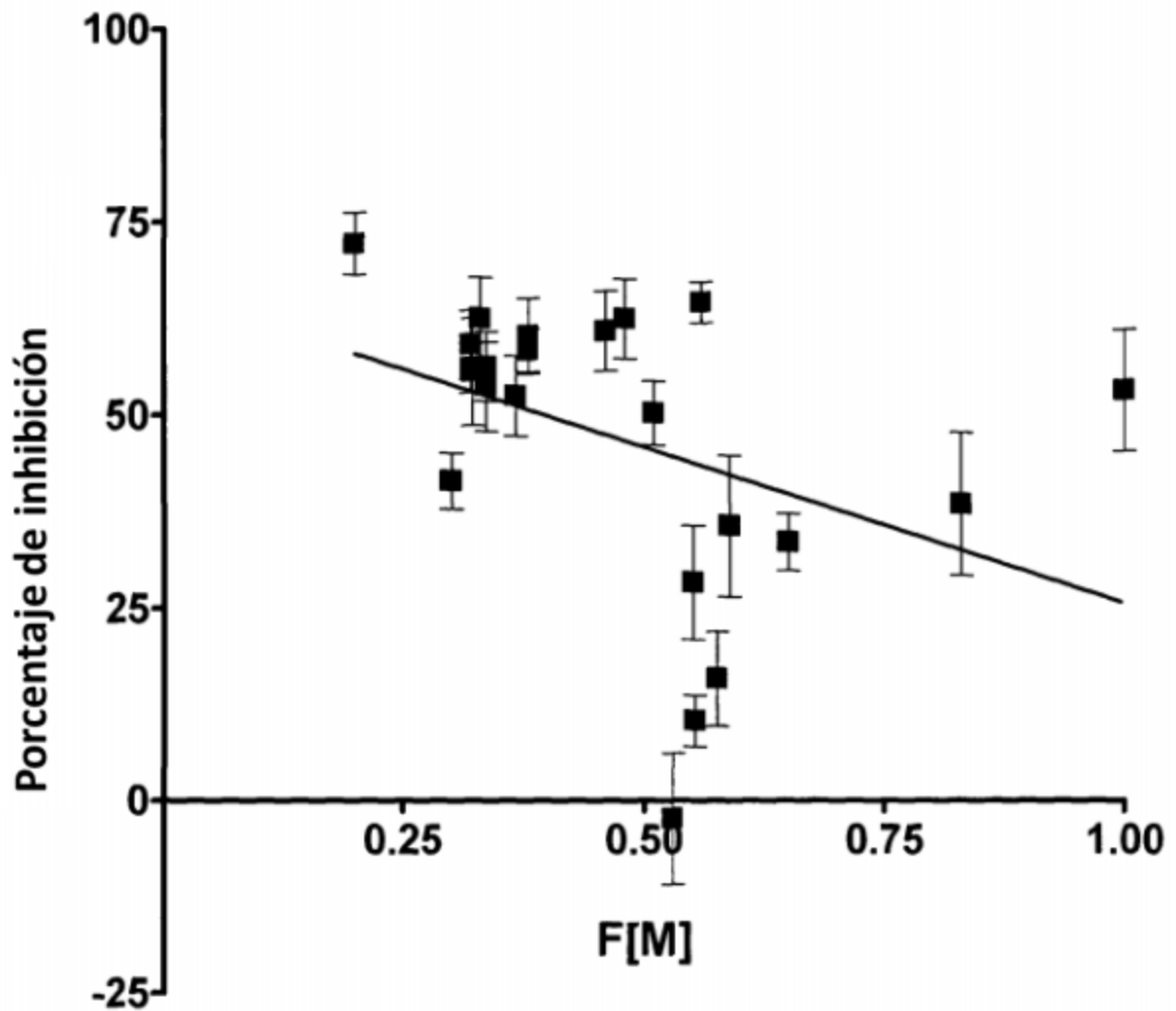


Figura 5 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato graficado contra la fracción de residuos de manuronato (F[M]) en los polímeros de alginato. Las barras de error mostradas son el error estándar de la media (n = 6).

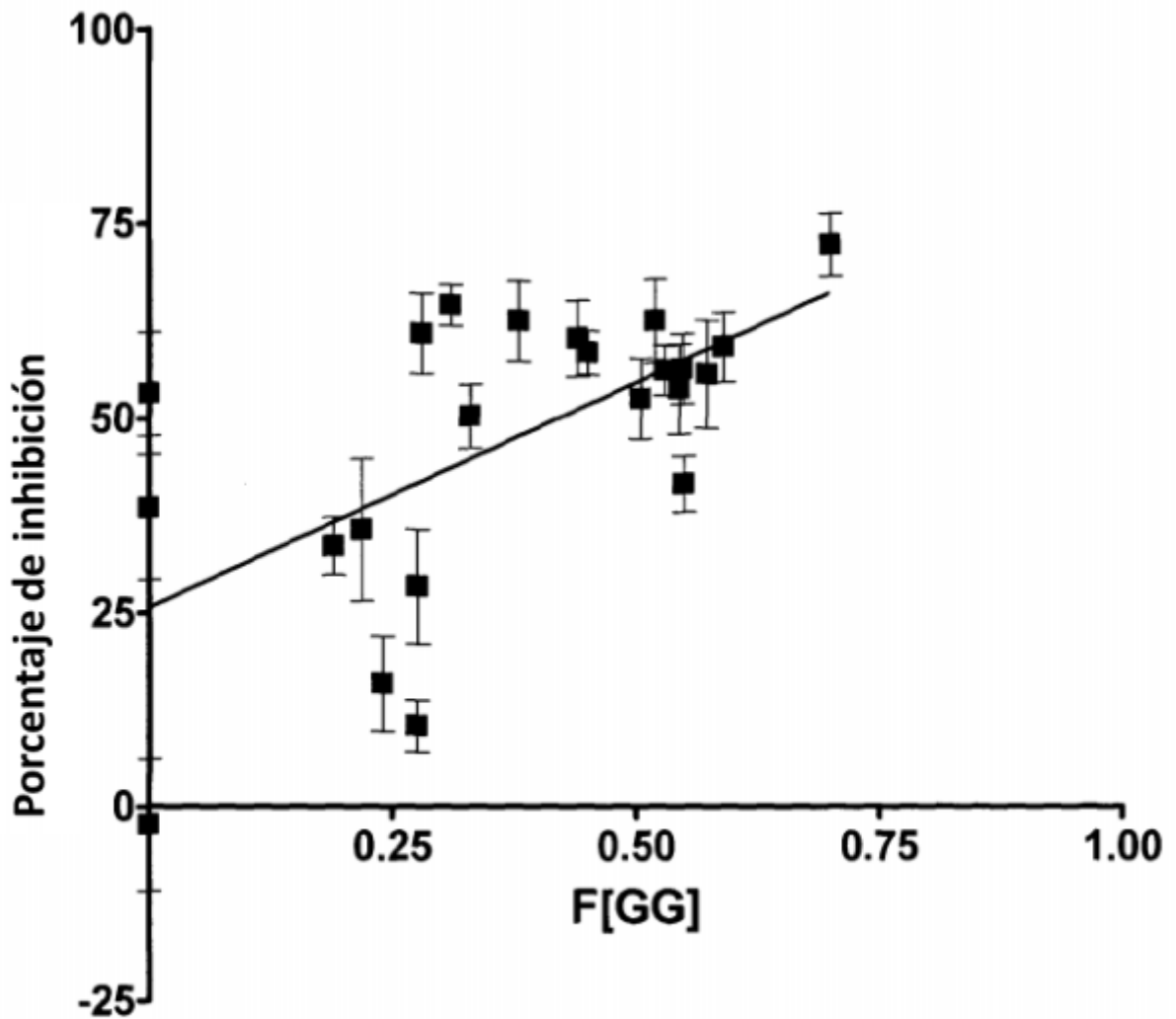


Figura 6 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato contra la fracción de dímeros de guluronato (F[GG]) en los polímeros de alginato. Las barras de error mostradas son el error estándar de la media (n = 6).

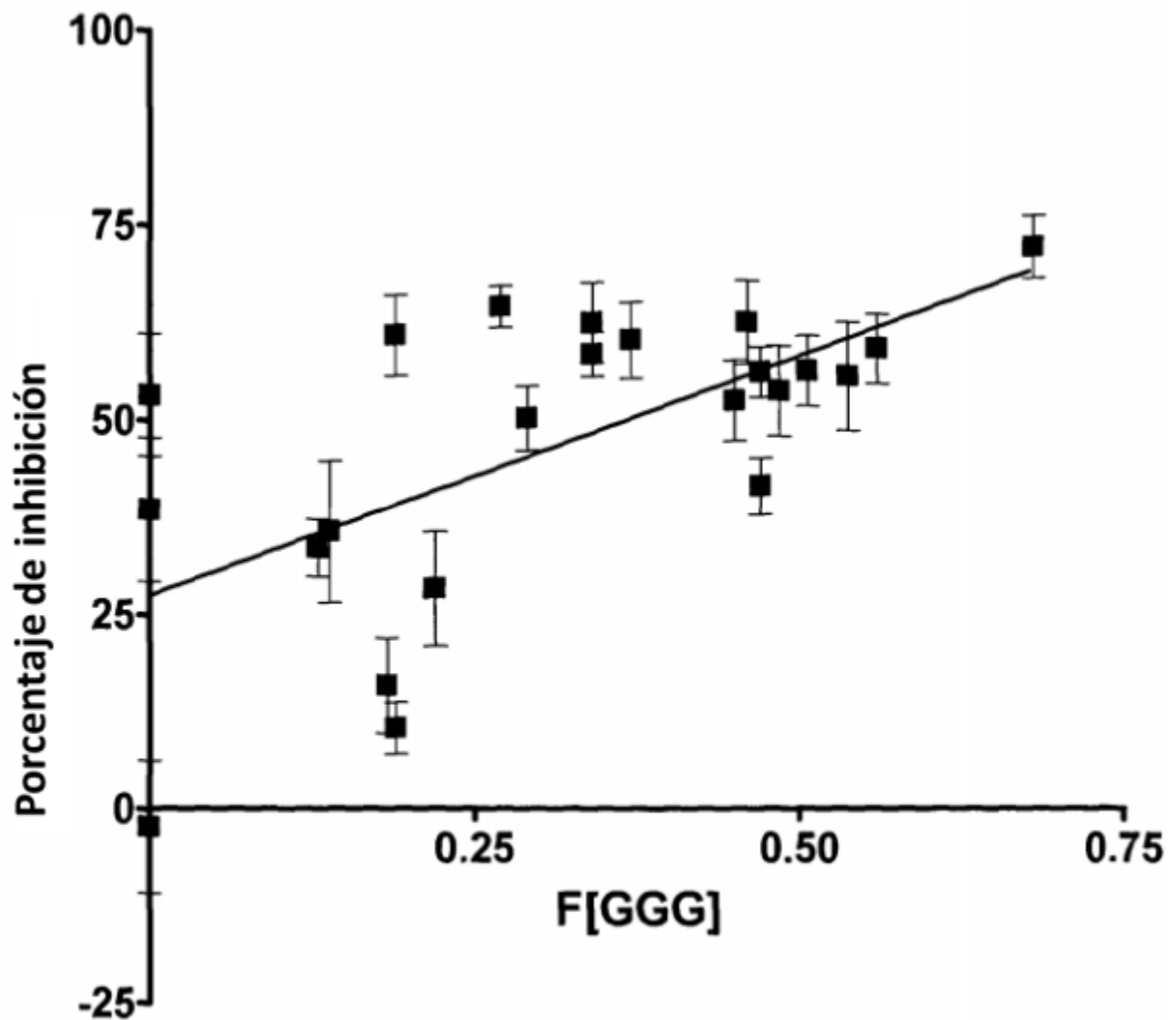


Figura 7 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato graficado contra la fracción de trímeros de guluronato (F[GGG]) en los polímeros de alginato. Las barras de error muestran el error estándar de la media (n = 6).

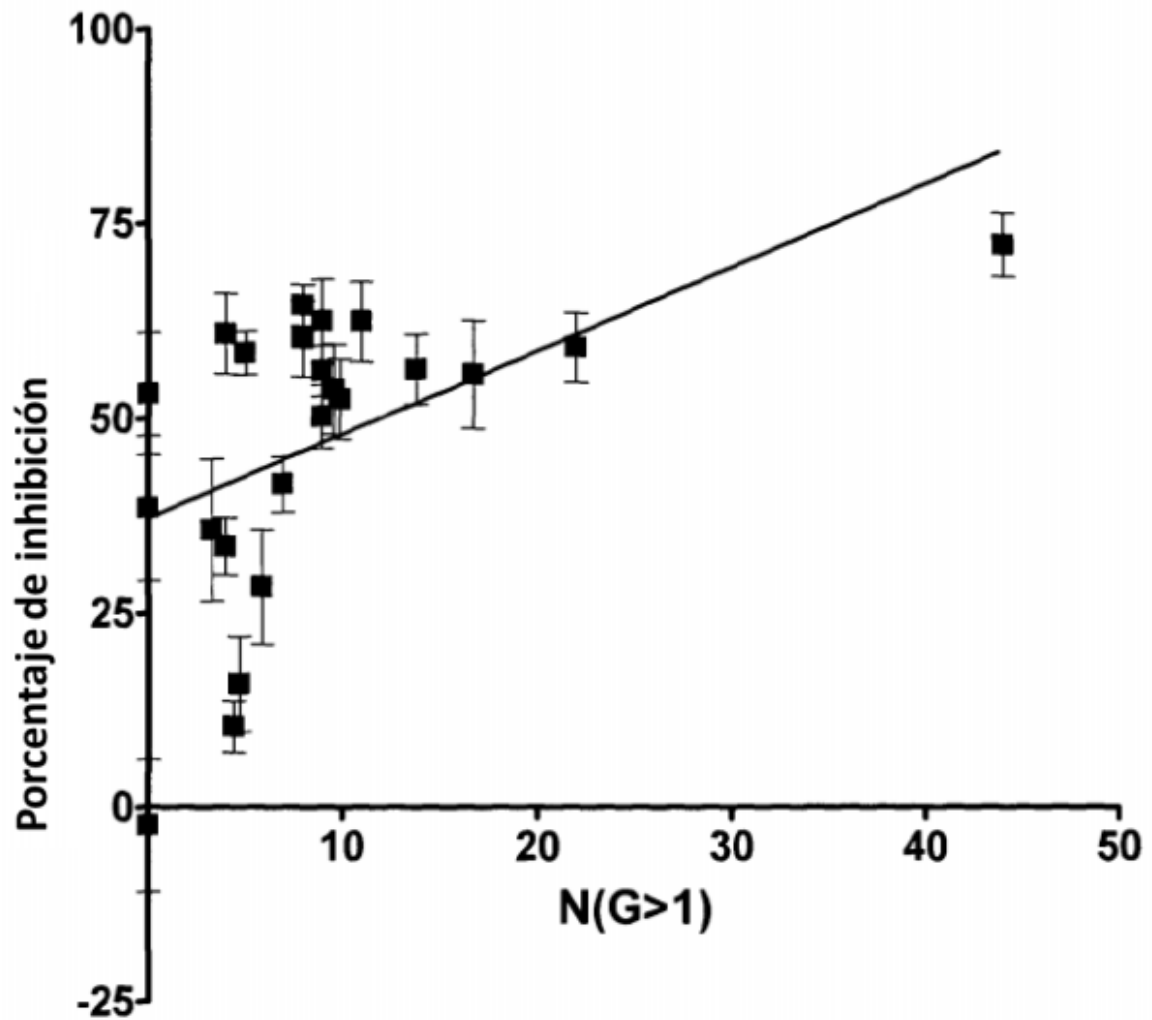


Figura 8 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato contra la longitud promedio de los bloques de guluronato ($N[G>1]$) en los polímeros de alginato. Las barras de error muestran el error estándar de la media ($n = 6$).

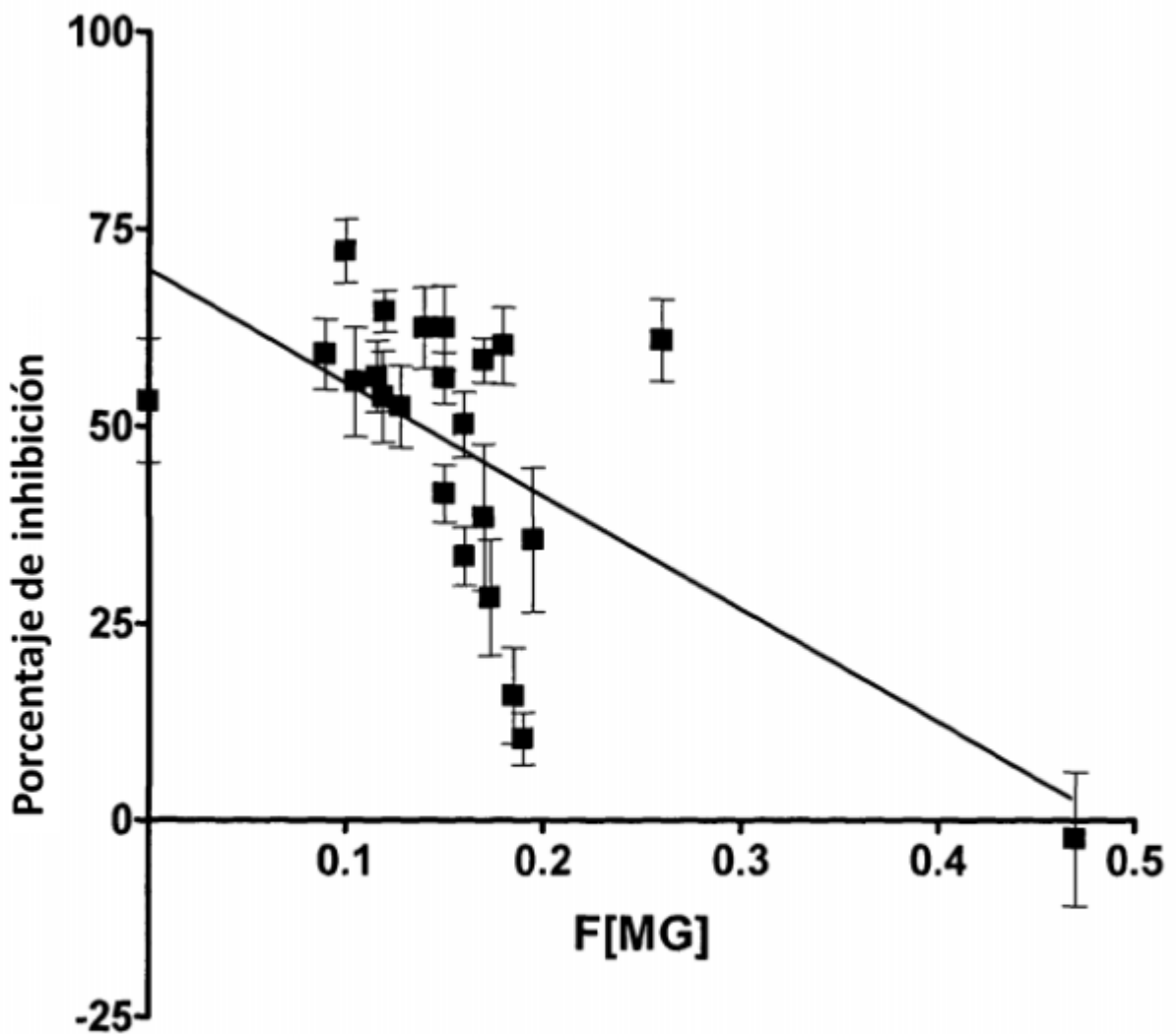


Figura 9 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato graficado contra la fracción de bloques MG o GM (F[MG]) en los polímeros de alginato. Las barras de error mostradas son el error estándar de la media (n = 6).

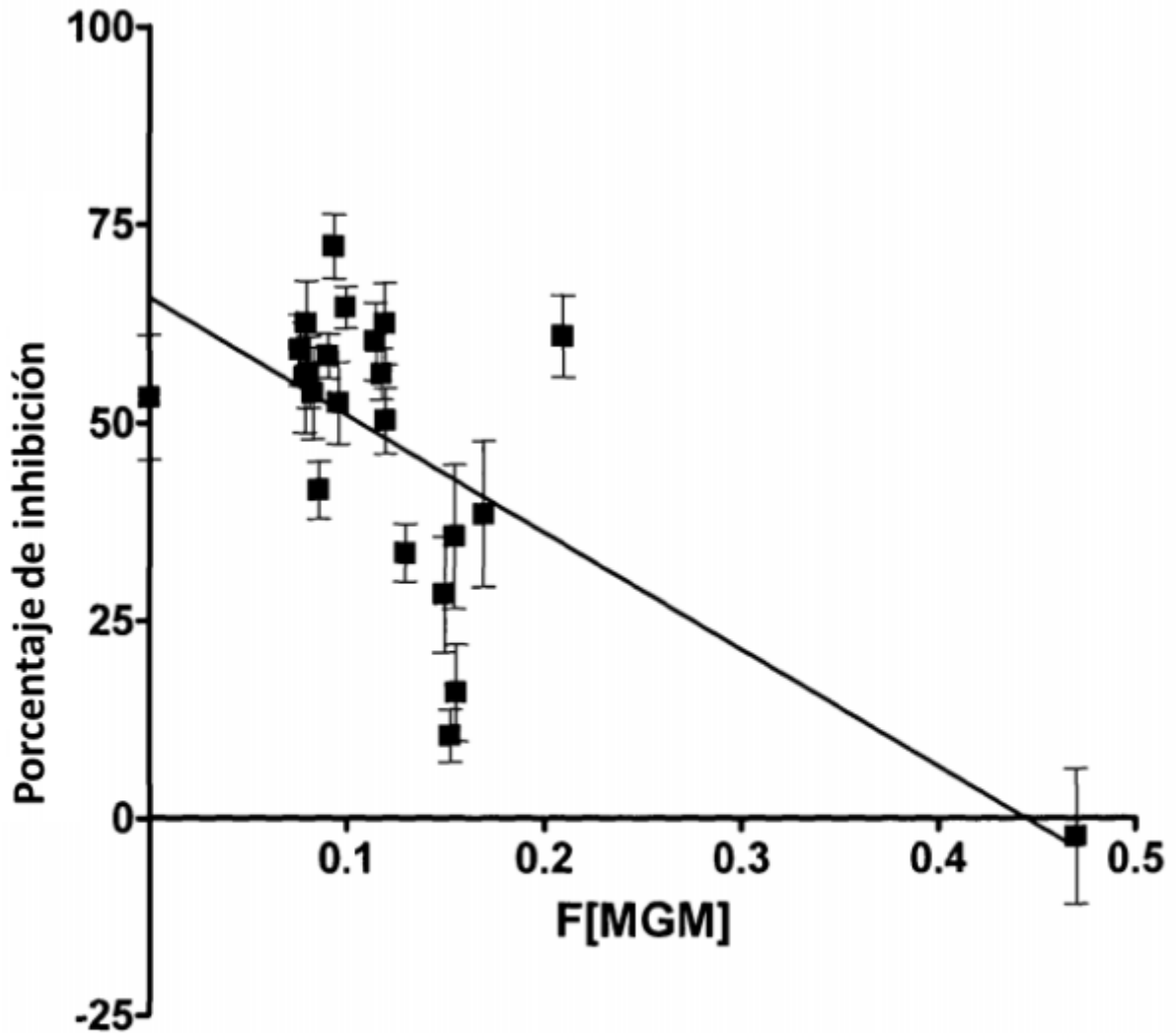


Figura 10 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato graficado contra la fracción de bloques MGM (F[MGM]) en los polímeros de alginato. Las barras de error muestran el error estándar de la media (n = 6).

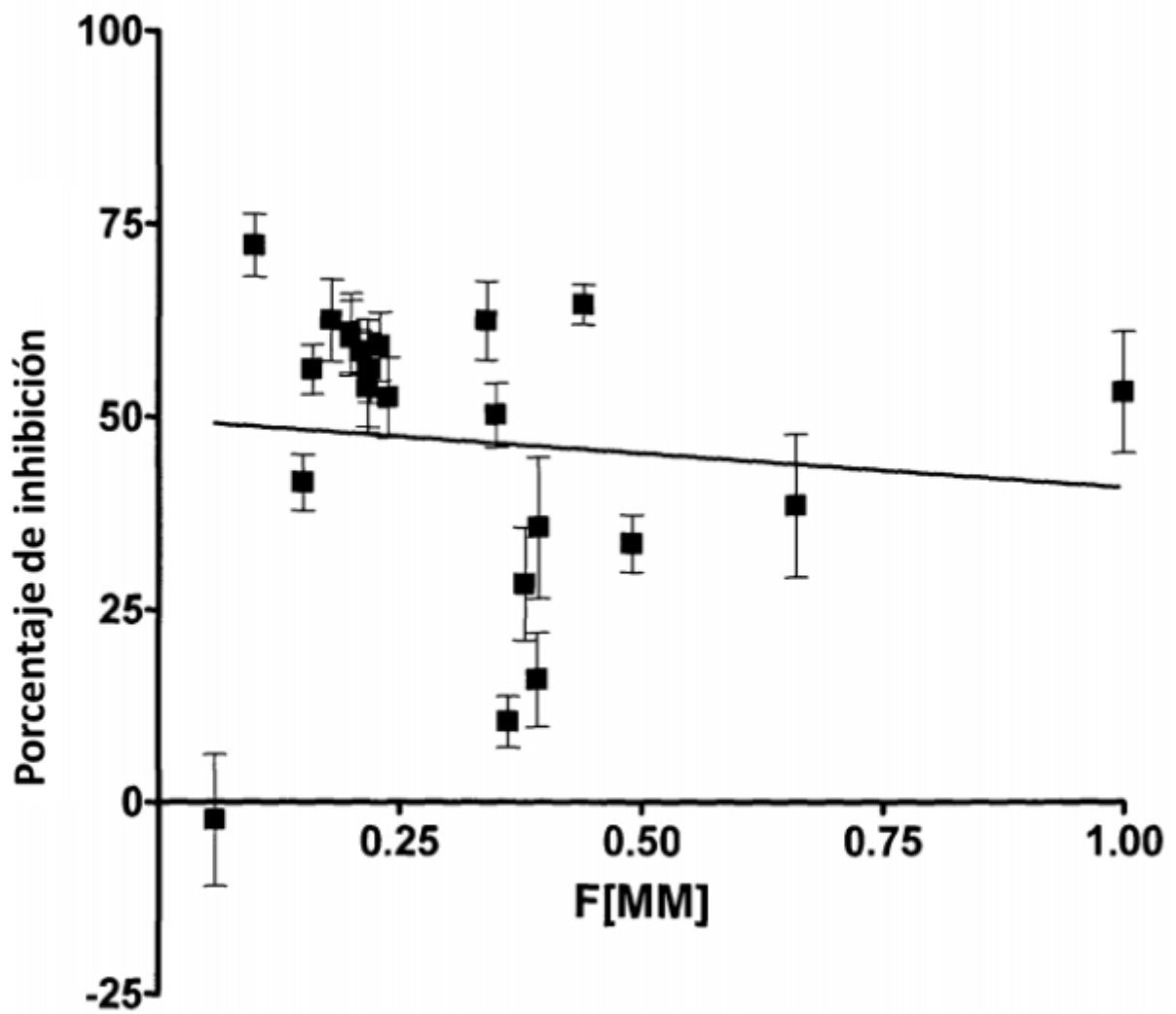


Figura 11 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato contra la fracción de bloques MM (F[MM]) en los polímeros de alginato. Las barras de error muestran el error estándar de la media (n = 6).

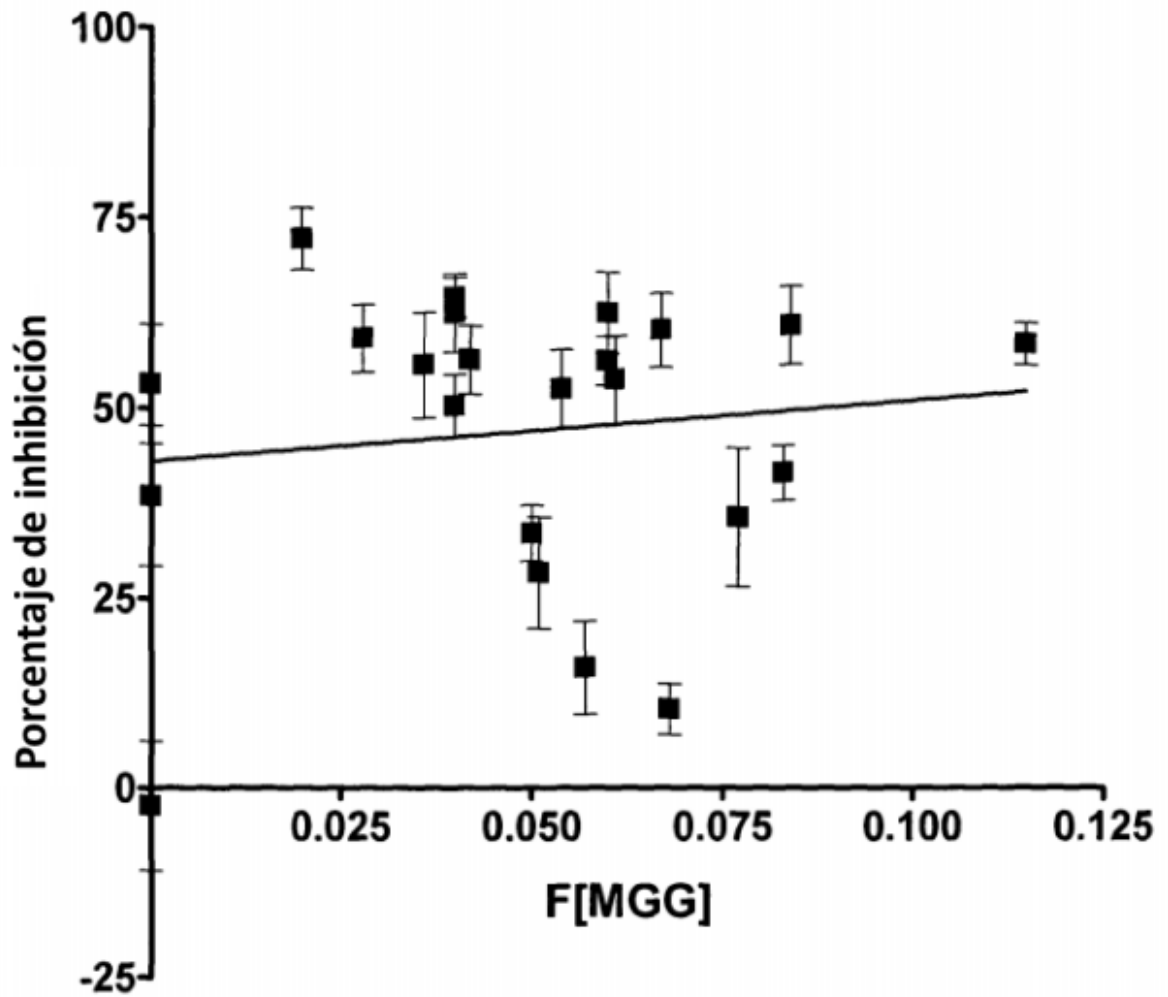


Figura 12 El porcentaje de inhibición de la lipasa a los 12 minutos mediante el uso de 3,43 mg/ml de alginato graficado contra la fracción de bloques MGG o GGM (F[MGG]) en los polímeros de alginato. Las barras de error muestran el error estándar de la media (n = 6).

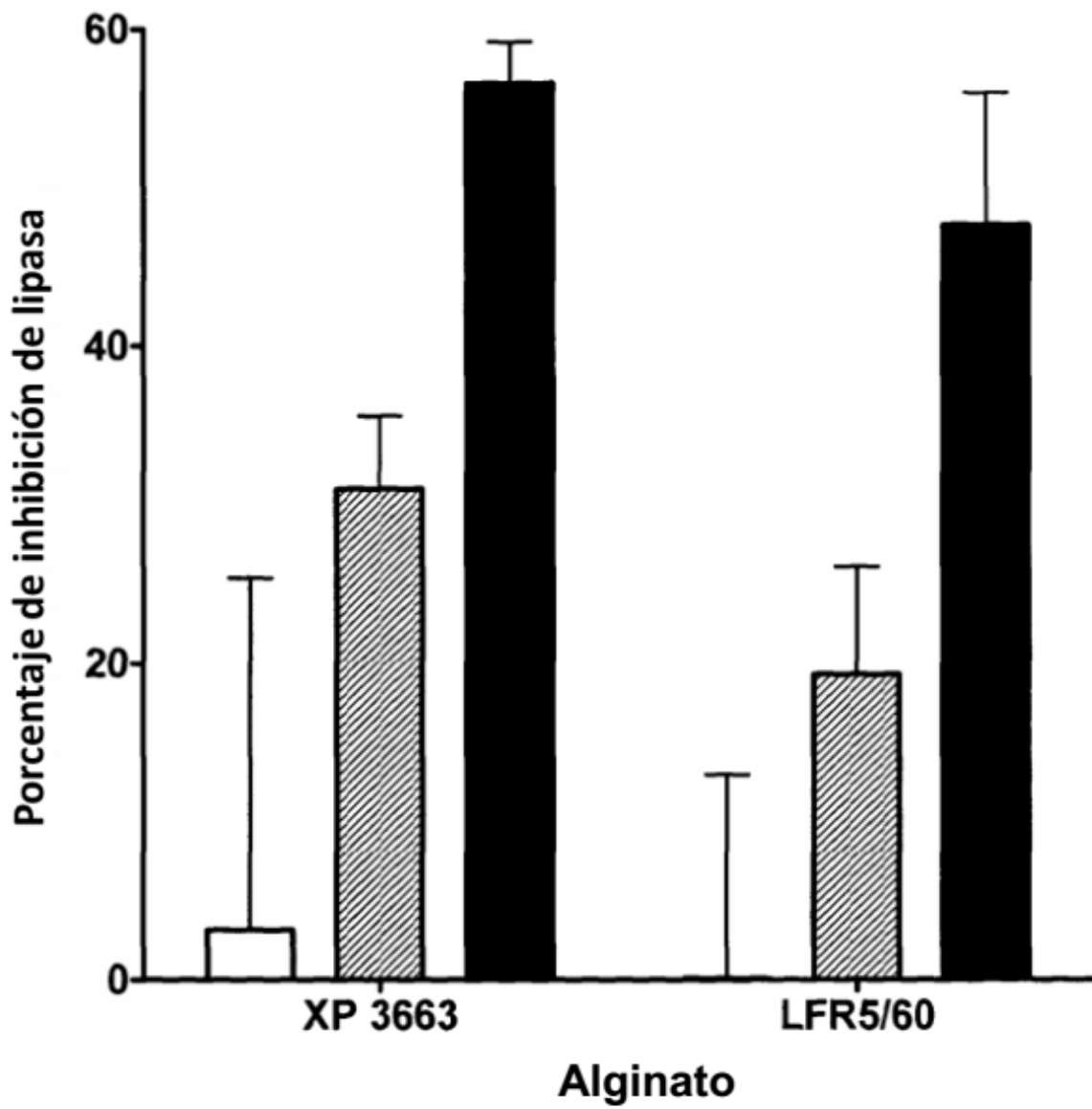


Figura 13 El nivel de inhibición de la lipasa alcanzado por los alginatos LFR5/60 y XP3663 a tres concentraciones, □ - 0,21 mg/ml, ▨ - 0,86 mg/ml y ■ - 3,43 mg/ml. Las barras de error son el error estándar de la media (n = 6).